

**Tóth Béla és Nánási Pál**

**SZULFONAMIDOK MEGHATÁROZÁSA BIOLÓGIAI  
FOLYADÉKOKBAN**

**B. Tóth — P. Nánási**

**DETERMINATION OF SULFONAMIDES IN BIOLOGICAL FLUIDS**

Tóth Béla és Nánási Pál

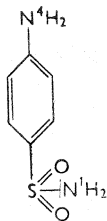
## SZULFONAMIDOK MEGHATÁROZÁSA BIOLÓGIAI FOLYADÉKOKBAN

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biokémiai és Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerveskémiai Intézete

Néhány évvel ezelőtt közöltünk egy módszert szulfonamidok (továbbiakban SA) meghatározására optikai fotométerrel (1). Módszerünknek most spektrofotométerre alkalmazott változatát közöljük, amit évek óta sikeresen alkalmazunk a legkülönbélebb eredetű biológiai folyadékok SA tartalmának meghatározására.

### A módszer elve

A diazotálható, tehát  $-N^4H_2$ -n szubsztituenst nem tartalmazó SA-ok esetében használható a módszer közvetlenül. Az  $-N^4H_2$ -ben szubsztituált származékokat előzetesen kémiai hidrolízisnek kell alávetni. A diazotálást *Vorozscov* szerint (2) szobahőmérsékleten végezzük híg oldatban. A kapcsolást  $\alpha$ -naftollal végezzük el, így élénkvrös trans-diazotátokat kapunk. A képződő



syn-diazotátoknak trans-diazotátokká történő átalakulása a lúgos közegben spontán megtörténik. Az alábbiakban megadott határok között a koncentráció egyenesen arányos a fényelnyeléssel minden SA abszorpciós maximumán.

Az 1. táblázatban foglaltuk össze a metodikát.

I. táblázat

0,1 – 2 ml biológiai folyadék (ha kisebb a tf. mint 2 ml, akkor  
ki kell egészíteni 2 ml-re deszt. vízzel)  
2 ml fehérje – kicsapószer (l. alább)  
5 perc kezelés 100°-os vízfürdőn  
lehűtés  
centrifugálás

Szabad  $N^4H_2$  vegyületek  
meghatározása  
hidrolízis nélkül  
2 ml szupernatáns  
0,1 ml 3%-os HCl

Kötött  $N^4H_2$  vegyületek  
meghatározása  
hidrolízissel  
3 ml szupernatáns  
0,15 ml 3%-os HCl  
100°-os vízfürdő  
lehűtés  
2,1 ml hidrolizátum

tf. kiegészítés 2,5 ml-ig 5 ml-es mérőlombikban  
0,1 ml 0,2%-os  $NaNO_2$   
5 perc diazotálás szobahőn  
1 ml 7%-os NaOH  
1 ml 0,2%-os  $\alpha$ -naftol  
tf. kiegészítés 5 ml-ig deszt. vízzel  
30 perc múlva leolvasás spektrofotométerben

A meghatározás alkalmazása a gyógyászatban leggyakrabban használt SA-okra

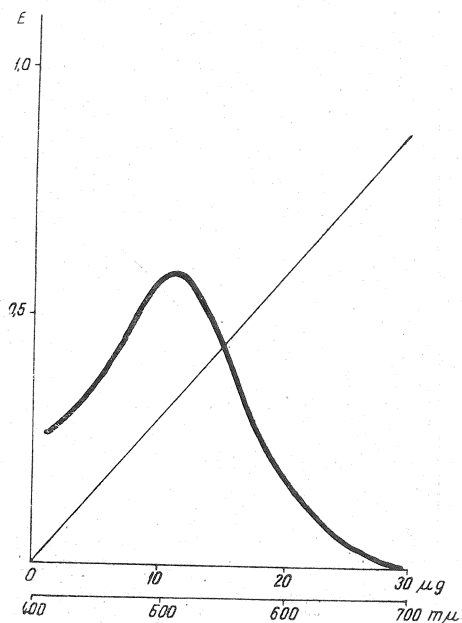
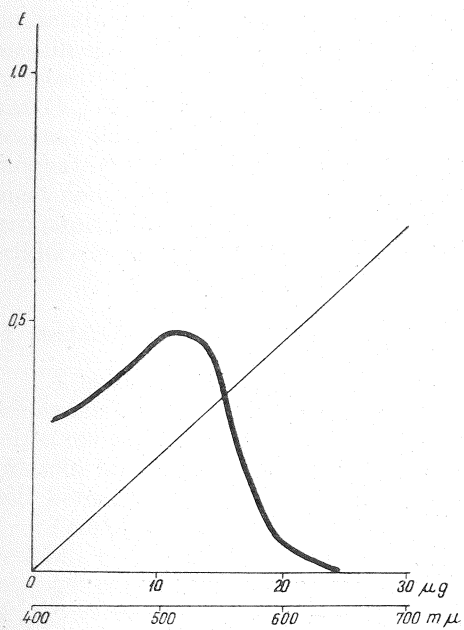
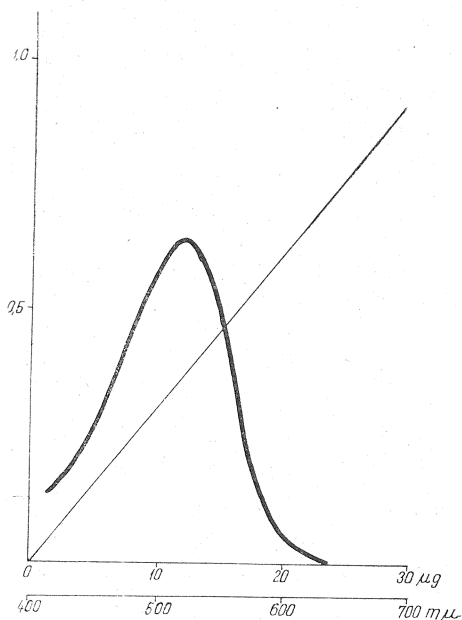
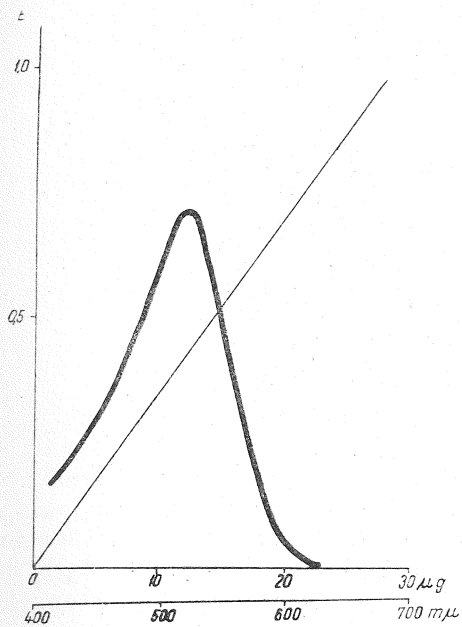
Módszerünket a következő anyagok esetében próbáltuk ki:

Deseptyl  
Superseptyl  
Salvoseptyl  
Sulfathyazol  
Ultraseptyl  
Sulfaguanidin  
Quinoseptyl  
Bucarban

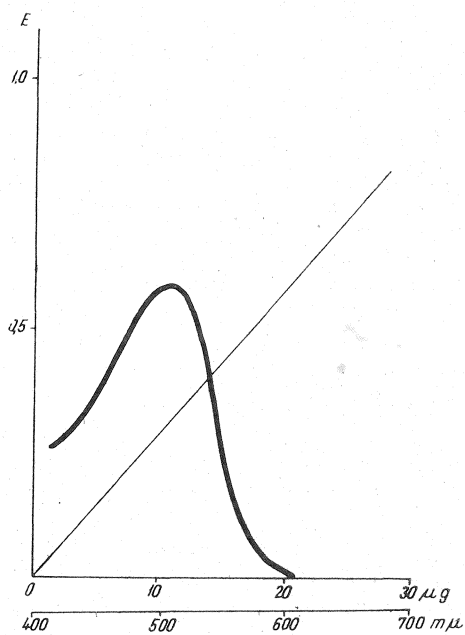
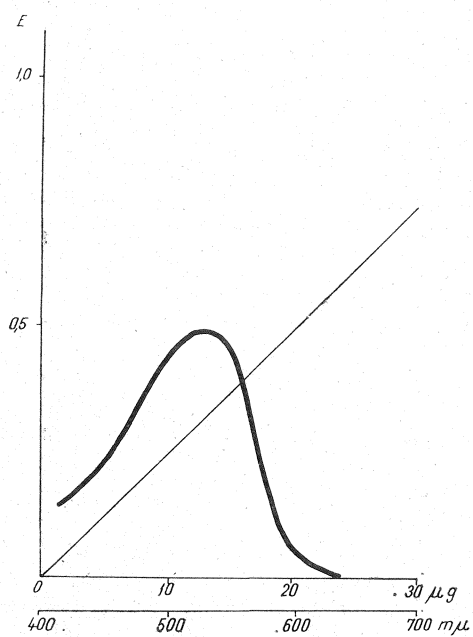
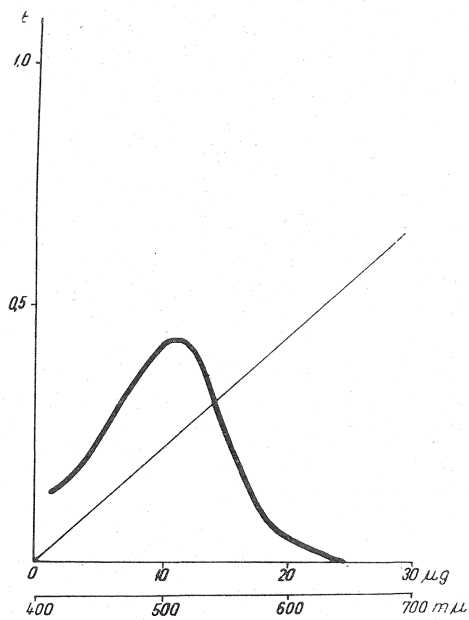
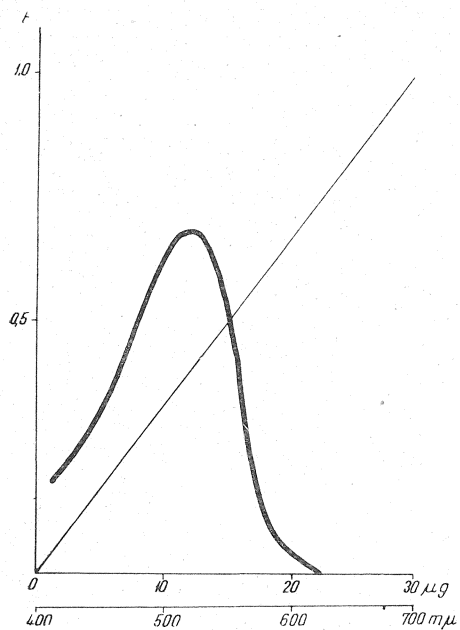
A vizsgált vegyületek abszorpciós görbéi és a kalibrációs görbék az 1–8-  
ábrán láthatók.

$N^4H_2$ -ben szubsztituált származékok meghatározása

A fenti vegyületek  $N^4H_2$ -ben szubsztituált származékai közül az alábbiakat vizsgáltuk vizes oldatban, teljes vérben, vérplazmában, vérsérumban, vizeletben, liquorban, csarnokvízben, valamint különböző állati szövetek présnedveiben. A 2. táblázatban tüntettük fel továbbá az egyes származékok 100%-os kémiai hidrolíziséhez szükséges hidrolízisidőket.



1-4. ábrák. Magyarázatukat l. a szövegben



5-8. ábrák. Magyarázatukat l. a szövegben

SA-származékok	Hidrolízisidő percekben
Deseptyl-glucosid .....	16,0
Deseptyl-lactosid .....	20,0
Superseptyl-glucosid .....	17,5
Superseptyl-methylenbisulphit ....	10,0
Ultraseptyl-glucosid .....	18,5
Salvoseptyl-glucosid .....	13,5
Salvoseptyl-glucosidbisulphit .....	15,5
Sulfathyazol-glucosid .....	17,1
Sulfaguanidin-glucosid .....	18,0
Quinoseptyl-glucosid .....	15,0
Bucarban-glucosid .....	19,5

Ezek a vegyületek az élő szervezetekben (in vivo) kisebb-nagyobb mértékben enzimatikusan hidrolizálódnak, és a belőlük felszabaduló alapvegyületek a metodikával közvetlenül meghatározhatók. Az in vitro, kémiai hidrolízissel meghatározott totális SA-értékekből levonva a megfelelő, közvetlenül meghatározható értékeket, megkapjuk az in vivo még le nem bomlott  $N^4H_2$ -ben szubsztituált vegyületek mennyiségét. A módszer tehát alkalmazható farmakológiai kontroll vizsgálatokra (vérszint-, liquorszint-, vizelet- és szövetszint-vizsgálatok).

Az élő szervezetekben a SA-ok fő kiürülési formája az  $N^4H_2$  csoportban acetilált származék (az acetilálás a májban történik). Az in vivo acetilálás mértéke fontos farmakológiai adat, mert az ily módon átalakult SA már hatástalan a baktériumokra. Módszerünk könnyen kombinálható a mikroacetilmeghatározási metodikákkal is. A kiindulási, triklór-ecetsavval fehérjementesített oldat helyett ilyenkor szulfo-szalicilsavval vagy nehézfém-sókkal (V, W, Mo) végzünk fehérjementesítést a biztonság kedvéért. A triklór-ecetsav-készítmények kismértékben ecetsavval is szennyezettek, ezért a mikro-meghatározást zavarják. Elvileg az egészen tiszta triklórecetsav nem zavar, mert nem illékony, és hevítés hatására  $CO_2$ -re és  $CHCl_3$ -ra bomlik, azonban a próbameghatározások bebizonyították, hogy 10–30% hibát okozhatnak egyes triklórecetsav-készítmények.

#### *A módszer pontossága és hibaforrásai*

A módszer pontosságát leginkább a szubjektív pipettázási manipulációk befolyásolják. A spektrofotometriás leolvasások hibája 0,001–0,005% a teljes mérési intervallumban. Mérési intervallum: 1–30  $\mu g$  SA pro 2 ml vizsgálandó biológiai folyadék. A módszer legfőbb hibaforrásait a reagensekben kell keresni.

*Triklór-ecetsav* : totális szintmeghatározásoknál megelégedhetünk a kereskedelmi p. a. készítménnyel, azonban acetilmeghatározásoknál ne használjuk fehérjementesítő szernek. Reagensként 10%-os oldatát alkalmazzuk. A nehézfém-sókat 20%-os ammóniumsók formájában használjuk az előírt arányban  $[(NH_4)_3VO_4; (NH_4)_2WO_4; (NH_4)_2MoO_4]$ . Szulfo-szalicilsavból 25%-os oldatot célszerű használni.

*HCl*:  $\text{Cl}_2$  mentes legyen, mert a kémiai hidrolízis alatt főleg az  $\text{N}^1\text{H}_2$  szubsztituensek átalakításával okozhat bajt, ui. a  $\lambda_{\text{max}}$  értékeket megváltoztatja.

*$\text{NaNO}_2$* : csak bomlatlan p. a. készítményt használjunk. Az oldat hetenként frissen készítendő.

*$\alpha$  naftol*: minden szennyezés a vakpróba-értékeket befolyásolja. Vizes oldatoknál a vak értékek 0,003–0,005 közé esnek  $\lambda_{\text{max}}$ -tól függetlenül. Fehérjementesített biológiai folyadékok vakpróbáinak extinció-értékeit az szabja meg, hogy honnan származnak. Általában nem haladják meg a 0,050 értéket egyik  $\lambda_{\text{max}}$ -ra sem. Legmagasabb a liquor és a vizelet vak extinciója átlag 0,030–0,050-nel, legalacsonyabb pedig a vér átlag 0,010–0,020 értékkel. A szövetek vak extinciói e két határ között ingadoznak, átlag 0,020–0,040 értékekkel. Az oldat hetenként frissen készítendő.

*Diazotálás*: a metodikában előírt 5 perc diazotálási időt feltétlenül be kell tartani. Ez 1 perccel több mint a szükséges, azonban ebből nem következik, hogy tetszőleges ideig diazotálhatunk. 15 perc fölött 1–2%-os eltérést kapunk értéknövelő irányban. 60 perces diazotálás kb. 10%-kal növeli az értéket.

*$\text{NaOH}$* : p. a. készítményt használjunk. A lúg mennyiségét az szabja meg, hogy a kapcsolás optimális pH-ja 10–12 közé esik. Ennél alacsonyabb pH-n sem a kapcsolás nem kvantitatív, sem a syn-diazotátok átfordulása transz-diazotátokká nem következik be. A pH csökkentése a  $\lambda_{\text{max}}$ -ot csökkenti, és narancs-, illetve sárga szín lép csak fel. A lúg túladagolása kismértékben csökkenti a színintenzitást, de a  $\lambda_{\text{max}}$  értékét nem befolyásolja.

## IRODALOM

1. Nánási, P., Tóth, B.: Acta Univ. Debr. Tom. III/2, 117 (1957).
2. Vorozscov, N. N.: Színezékek és közbelső termékek szintézisének alapjai (Szikra 1954) 427 és 436–437. old.

## Összefoglalás

SA-ok biológiai folyadékokban történő meghatározására évek óta sikeresen alkalmazzuk  $\alpha$ -naftolos módszerünket, amelynek most spektrofotométerre alkalmazott változatát közöljük. Az eredetileg optikai fotométerre (Stufo) leírt módszernél pontosabb és érzékenyebb új módszer alkalmazását írjuk le, a gyógyászatban leggyakrabban használt SA-okra. Részletesen tárgyaljuk a módszer pontosságát befolyásoló tényezőket és a hibaforrásokat, valamint a hibák kiküszöbölésének lehetőségeit és feltételeit.

A szerzők címe: Dr. Tóth Béla tanársegéd, Debrecen, Orvostudományi Egyetem Biokémiai Intézete és Dr. Nánási Pál docens, Tudományegyetem Szerves Kémiai Intézete.

Tóth B. – Nánási P.

## DETERMINATION OF SULFONAMIDES IN BIOLOGICAL FLUIDS

We successfully used a method for the determination of different SA derivatives in biological fluids several years. Its variation is described here as applied for spectrophotometer. This procedure is more exact and sensitive than the optical one, working with Pulfrich photometer for measuring the SA-s generally used in therapy. We discuss in detail the factors influencing the accuracy, the sources of errors and the possible elimination of them.